

# 血管内皮生长因子及其受体在离体培养椎体终板退变过程中的表达

展嘉文<sup>1,2</sup> 朱立国<sup>1,2△</sup> 王尚全<sup>1</sup> 冯敏山<sup>1,2</sup> 尹训璐<sup>1</sup> 韩涛<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:研究持续压力对椎体终板内血管内皮生长因子(VEGF)及其受体(VEGFR)表达的影响,进一步探讨椎体终板退变的发生机制。方法:将 16 只新西兰白兔处死后在无菌条件下取出脊柱运动节段,随机分为对照组与压力组,均放入离体加载和培养装置中进行培养,其中压力组予持续 29.4 N 压力,对照组不予压力,于培养前及培养后第 3、7 及 14 天,两组各取 8 个标本,对其椎体终板进行苏木精-伊红染色,应用 ELISA 与实时 PCR 检测 VEGF 及 VEGFR 的表达。结果:椎体终板形态完整性在持续压力条件下逐渐被破坏;VEGF 蛋白浓度在新鲜标本终板中为 $(450.74 \pm 9.74)$  ng/L,持续压力导致 VEGF 蛋白浓度降低为 $(327.57 \pm 6.00)$  ng/L,与对照组 $(392.88 \pm 2.13)$  ng/L 相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。VEGFR 蛋白浓度在新鲜标本终板中为 $(11.02 \pm 2.31)$  ng/L,持续压力导致 VEGF 蛋白浓度显著降低为 $(8.11 \pm 2.17)$  ng/L,与对照组 $(10.02 \pm 1.53)$  ng/L 相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。实时 PCR 检测显示持续压力导致 VEGF 基因相对表达量减少 $(0.842 \pm 0.002)$ ,与对照组 $(0.965 \pm 0.005)$ 相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:持续压力导致离体培养兔脊柱运动节段内椎体终板 VEGF 的表达减少,提示 VEGF 参与了椎间盘退变过程。

**[关键词]** 椎体终板;血管内皮生长因子;受体;持续压力;椎间盘退变

**[中图分类号]** R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2018)07-0007-04

## Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptor During Degeneration of Endplates in Vitro

ZHAN Jiarwen<sup>1,2</sup> ZHULiguo<sup>1,2△</sup> WANG Shangquan<sup>1</sup> FENG Minshan<sup>1,2</sup> YIN Xunlu<sup>1</sup> HAN Tao<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Wangjing Hospital of Chinese Academy of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

<sup>2</sup>Beijing Muniapal Key Laboratory of Traditional Chinese Mediaine Bone-setting Techuology, Beijing 100102, China.

**Abstract Objective:** To study the effect of constant compressive load on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) in the vertebral endplate, and further explore the mechanism of vertebral endplate degeneration. **Methods:** All 16 New Zealand white rabbits were sacrificed, and the spinal segments were removed under aseptic conditions and were randomly divided into the controls group and the loading group. The specimens were isolated and cultured in the culturing and loading devices, in which the loading group were treated with constant compressive load of 3kg, the controls without load. Tissue integrity, matrix synthesis, and the matrix gene expression profile were assessed after 3, 7 and 14 days of culture and were compared with those of fresh tissues. **Results:** The results showed that the morphological integrity of the vertebral endplate was gradually destroyed under constant compressive load; The concentration of VEGF protein in fresh tissues was $(450.74 \pm 9.74)$  ng/L, and the load resulted in a decrease in VEGF protein concentration $(327.57 \pm 6.00)$  ng/L, which was significantly different from that in the controls $(392.88 \pm 2.13)$  ng/L ( $P < 0.05$ ). The concentration of VEGFR protein was $(11.02 \pm 2.31)$  ng/L in fresh, and the concentration of VEGF decreased significantly $(8.11 \pm 2.17)$  ng/L after constant load, which was significantly different from that in controls $(10.02 \pm 1.53)$  ng/L ( $P < 0.05$ ). RT-PCR detection showed that the relative expression of VEGF gene was reduced $(0.842 \pm 0.002)$  by constant load, and the difference was significant with controls $(0.965 \pm 0.005)$  ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The constant compressive load leads to a decrease in the expression of VEGF in the vertebral endplate of the spinal motion segments in ex vivo culturing, indicating that VEGF is involved in the process of intervertebral disc degeneration.

**Keywords:** vertebral endplate; vascular endothelial growth factor; receptor; constant compressive load; vertebral degeneration

基金项目:国家中医药管理局国家中医临床研究基地业务建设科研专项课题(JDZX2015274)

北京地区中医骨科康复服务能力与技术平台规范化建设项目(110019)

国家体育总局中医特色技术在体育运动中的应用(HXKT2017001)

<sup>1</sup> 中国中医科学院望京医院(北京,100102)

<sup>2</sup> 中医正骨技术北京市重点实验室

△通信作者 E-mail:zhulg95@aliyun.com

椎体终板是椎间盘营养供应的重要途径<sup>[1,2]</sup>,研究表明异常压力下终板损伤导致血管供应减少引起营养代谢及物质转运功能障碍是椎间盘退变的始动因素<sup>[3,4]</sup>。软骨细胞是软骨终板内的唯一细胞类型,其功能受到多种细胞因子的调节,其中血管内皮生长因子(VEGF)与终板内血管新生及椎间盘退变关系密切<sup>[5,6]</sup>。但 VEGF 在退变中的作用仍存在争议<sup>[7]</sup>,探明 VEGF 与椎间盘退变之间的分子作用机制,对相关疾病的治疗有重要意义。本研究应用离体培养兔脊柱运动节段压力退变模型,观察持续压力对椎体终板内 VEGF 及其受体 VEGFR 表达的影响,以进一步明确椎体终板退变与 VEGF 的关系。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

健康新西兰兔 16 只,4~6 月龄,雌雄不限,2.5~3.0 kg 左右,中国中医科学院实验动物中心提供。

### 1.2 实验方法及步骤

**1.2.1 取材及培养** 根据随机数字表法将 16 只实验新西兰兔随机分为压力组与空白对照组。新西兰兔麻醉后,耳缘静脉给予肝素钠,5 min 后空气栓塞处死,带至超净工作台;立即在无菌条件下自背部纵切口,自尾部完整取出腰段及下位胸段脊柱,入高渗肝素 PBS 液冲洗;在 2.5 倍放大镜下应用咬骨钳、手术刀片切取 T<sub>12</sub>L<sub>1</sub>,L<sub>2</sub>L<sub>3</sub>,L<sub>4</sub>L<sub>5</sub>,L<sub>6</sub>S<sub>1</sub> 脊柱运动节段(4 节段),自相邻椎间盘的椎体与骨性终板结合处锐性分离,得到完整脊柱运动节段,包括髓核(NP)、纤维环(AF)、上下软骨终板(EP)及相邻椎体(VB);用带有 18 号针头的无菌注射器吸取含肝素的高渗 PBS 液冲洗标本表面的碎屑及终板上的血凝块,于含肝素 HBSS 液(含 1 000 U/mL 青霉素,1 mg/mL 链霉素)中漂洗 2 min。

两组样本放入笔者研制的脊柱运动节段离体加载和培养装置中,压力组予 29.4 N 压力,对照组不予负荷。两组均予细胞培养液 DMEM,含有 10% 胎牛血清、25 μg/mL 抗坏血酸、50 mg/mL 庆大霉素,并用 NaCl 将细胞培养液的渗透压调整到 410 mmol/kg<sup>[8]</sup>。

两组均置于 5% CO<sub>2</sub>,37 °C 恒温培养箱进行整体培养,每 2 d 更换培养液。分别在培养前(0 d)和培养后第 3、7 及 14 天,取出标本并沿软骨终板下 2 mm 处分离出椎体终板。

**1.2.2 常规组织学检查** 各组标本咬除椎体,分离出椎体终板核,常规固定、脱钙、包埋,切片厚度 5 μm,苏木素-伊红染色、封片。观察椎体终板的组织形态学变化。

**1.2.3 ELISA 法检测** 根据 ELISA 试剂盒的说明,将标准品用稀释液定比稀释,充分混匀。酶标板各孔依次编号,每孔加包被抗体(100 μL),并加入 50 μL 标准液或样品,混匀封口。室温下孵化 2 h,弃液,冲洗液清洗 4 次。每孔加入 200 μL 相关蛋白酶联抗体,封口室温下孵化 2 h,弃液,冲洗液清洗 4 次。避光情况下每孔加入 200 μL 底物显色溶液,混匀放置 30 min。再加 50 μL/孔反应终止液,混匀。30 min 内酶标仪测定各孔吸光度值 D(550 nm),绘制标准曲线,计算样品中 VEGF 及 VEGFR 的含量。

**1.2.4 实时 PCR 检测** 收集各时间点椎体终板,加入适量 Trizol 裂解液,将样品置于冰上以 30% 振幅超声,工作 3 s 后间歇暂停 2 s,每个样品累积超声约 30 s。随后陆续以氯仿、异丙醇、酒精等试剂对总 RNA 进行提取,并测定 RNA 的浓度;用 RT 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA,然后以 cDNA 第 1 链作为模板行 PCR 扩增。PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 20 s,58 °C 退火 20 s,72 °C 延伸 20 s,32 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统软件测定灰度值并计算相对强度。

**1.2.5 统计学方法** 应用 SPSS 16.0 统计学软件,所有计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组内比较采用单因素方差分析,两组数据之间比较采用 *t* 检验,时间因素单独效应分析采用重复测量方差分析,测量取双侧检验, $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 退变椎体终板的组织形态学特征

培养前苏木精-伊红染色可见终板结构完整,基质内富含软骨细胞,体积大、排列紧密,大量束状胶原纤维排列整齐,软骨终板下可见血管芽。对照组培养 2 周,完整性仍好,但软骨细胞及基质染色变浅,血管芽减少;压力组培养后,软骨细胞逐渐分散、数目减少、体积缩小,血管芽数量显著减少,残留软骨细胞的胞质及胞核小于正常软骨细胞,胶原纤维排列紊乱,软骨基质染色变浅(见图 1)。

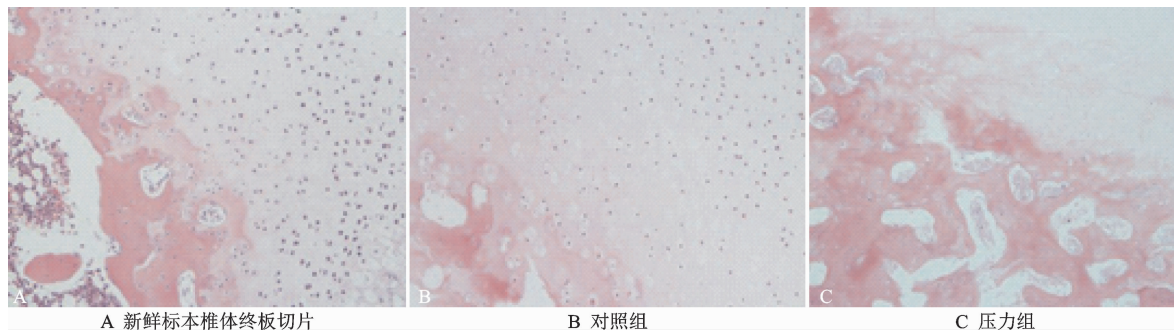


图 1 对照组与压力组椎体终板切片苏木精-伊红染色(100×)

### 2.2 各组椎体终板中 VEGF 及 VEGFR 蛋白的浓度 ELISA 法检测各组各培养时间点椎体终板组织

中 VEGF 的浓度,如表 1 所示:空白对照组,离体培养后较新鲜标本组织中 VEGF 浓度下降( $P <$

0.05),培养 1 周后进一步下降( $P<0.05$ ),1 周与 2 周差异无统计学意义( $P>0.05$ )。压力组,培养 3 d 时较培养前下降,但与对照组相比差异无统计学意

表 1 不同时间点两组椎体终板内 VEGF 蛋白浓度的比较(ng/L, $\bar{x}\pm s$ )

组别	培养前	第 3 天	第 7 天	第 14 天	<i>F</i>	<i>P</i>
对照组	459.18±7.05	427.06±5.91 <sup>1)</sup>	395.26±5.03 <sup>1)2)</sup>	392.88±2.13 <sup>1)</sup>	20.417	<0.001
压力组	450.74±9.74	420.21±9.86 <sup>1)</sup>	367.95±7.25 <sup>1)2)3)</sup>	327.57±6.09 <sup>1)2)3)</sup>	27.754	<0.001

注:1)与同组培养前比较, $P<0.05$ ;2)与同组前一时间点比较, $P<0.05$ ;3)与对照组同时间点比较, $P<0.05$ 。

VEGFR 浓度如表 2 所示;两组培养后较培养前均下降( $P<0.05$ ),加压组较对照组下降更加显著( $P<0.05$ ),对照组培养 1 周内差异无统计学意义( $P>$

表 2 不同时间点两组椎体终板内 VEGFR 蛋白浓度的比较(ng/L, $\bar{x}\pm s$ )

组别	培养前	第 3 天	第 7 天	第 14 天	<i>F</i>	<i>P</i>
对照组	11.27±2.02	10.99±1.93 <sup>1)</sup>	10.29±2.13 <sup>1)</sup>	10.02±1.53 <sup>1)2)</sup>	14.020	<0.001
压力组	11.02±2.31	10.02±1.76 <sup>1)3)</sup>	8.24±1.26 <sup>1)2)3)</sup>	8.11±2.17 <sup>1)3)</sup>	16.864	<0.001

注:1)与同组培养前比较, $P<0.05$ ;2)与同组前一时间点比较, $P<0.05$ ;3)与对照组同时间点比较, $P<0.05$ 。

2.3 实时 PCR 检测椎体终板中 VEGF 的表达

实时 PCR 检测 VEGF 基因表达如表 3 所示;与培养前相比,对照组第 3 天时 VEGF 表达水平差异无统计学意义( $P>0.05$ ),培养至第 14 天表达水平较新鲜标本降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),但培养期

表 3 不同时间点两组椎体终板内 VEGF 基因相对表达量的比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	培养前	第 3 天	第 7 天	第 14 天	<i>F</i>	<i>P</i>
对照组	1.009±0.037	0.997±0.006	0.990±0.001	0.965±0.005 <sup>1)</sup>	1.903	<0.001
压力组	0.960±0.043	0.851±0.010 <sup>1)2)</sup>	0.848±0.001 <sup>1)2)</sup>	0.842±0.002 <sup>1)2)</sup>	1.276	<0.001

注:1)与同组培养前比较, $P<0.05$ ;2)与对照组同时间点比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

椎体终板是椎间盘营养供应的重要途径,软骨终板中央部位的通透性较强,与其相接的软骨下骨部位存在着密集的微血管、血窦及毛细血管,营养物质通过这些循环道路透入终板浅层,再经渗透进入髓核及纤维环内<sup>[9,10]</sup>。

3.1 异常应力对椎体终板的影响

椎间盘内细胞减少、基质中营养成分供给不足是导致椎间盘退变的关键原因<sup>[11]</sup>,而异常应力是诱导其病变的重要诱因<sup>[12]</sup>。当脊柱承受较大压力时,椎体终板的形态改变甚至破裂,终板内各区蛋白聚糖含量变化,促进其钙化、降低弹性、削弱吸收震荡和均匀传递载荷的能力<sup>[13]</sup>;且代谢产物积聚于间盘内可激活分解酶,造成基质破坏与细胞代谢障碍、死亡。异常应力还使软骨下骨代谢加强、骨重塑加快致其增厚、骨密度增高和硬化,使血流减慢、血液瘀滞,进而造成血管内皮细胞的损伤和血管栓塞,导致终板下血管分布进行减少造成椎间盘营养障碍<sup>[14]</sup>。当轴向压力超过承受极限时,椎体终板较薄的中央部甚至破裂造成髓核突入椎体松质骨内,形成许莫氏结节<sup>[15]</sup>。

异常高力可能造成血管内皮细胞的损伤和血管栓塞,这种变化的结果将是终板下血管分布进行性减少并导致椎间盘营养障碍<sup>[16]</sup>。但异常应力导致血管内

义( $P>0.05$ );培养 1 周后,浓度显著下降,与对照组差异有统计学意义( $P<0.05$ ),培养 2 周时浓度进一步降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

0.05),2 周时显著下降,加压组培养 7 天较 3 天时显著下降( $P<0.05$ ),培养 1 周后差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

间差异无统计学意义( $P>0.05$ );压力组第 3 天时 VEGF 表达差异有统计学意义( $P<0.05$ ),培养期间差异无统计学意义( $P>0.05$ ),各时间点与对照组相比差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。

皮细胞损伤的机制缺乏深入研究。

3.2 椎体终板 VEGF 的作用

研究表明终板软骨内血管内皮生长因子及其受体的表达明显减少<sup>[17]</sup>,可能是终板下毛细血管减少的重要原因。血管内皮细胞生长因子是在胚胎发生和创伤愈合过程中启动血管形成的一个高度特异的有丝分裂原,也是一种有效的血管通透性诱导因子,VEGF 的表达与组织中微血管的密度及新生血管的数量密切相关,它可以促进血管发生,血管形成,内皮细胞增殖,迁移,增强血管通透性,属于生长因子的一种<sup>[18]</sup>。

VEGF 可由许多正常细胞产生和分泌,主要通过旁分泌途径作用于内皮细胞。通过一系列信号传导使内皮细胞分裂、增殖、迁移,形成新生血管,建立侧支循环,增加缺氧、缺血组织的氧供、血供,从而减轻或逆转细胞的受损,改善器官功能等多种功能<sup>[19]</sup>。VEGFR 是 VEGF 介导血管新生的主要功能受体,VEGF 与配体结合后通过一系列的生物信号转导作用,促进内皮细胞的促分裂、增殖与迁移,VEGFR 是新生血管内皮细胞中特有的上调性标志物之一<sup>[20]</sup>。

研究表明在正常关节软骨细胞中存在 VEGF 表达,并且正常椎体终板软骨细胞 VEGF 的表达明显高于退变终板软骨细胞<sup>[21]</sup>。软骨细胞是终板中 VEGF 的重要来源细胞,VEGF 的表达上调可促进终板下毛

细血管生成,维持终板下血管网的数量,延缓椎体终板退变,从而保证椎间盘的营养供应。相关实验还证实终板退变过程中 VEGF 和 VEGFR 的表达发生明显的变化,VEGF 分泌的减少导致终板血管芽的维持不足,引起椎间盘退变<sup>[22]</sup>。

### 3.3 持续压力负荷对椎体终板内 VEGF 的影响

笔者前期研究发现<sup>[23,24]</sup>,持续的静态加载会逐渐抑制椎间盘的细胞合成代谢活力,破坏椎体终板内营养通道,造成椎间盘营养供应障碍,进而引发椎间盘退变。相关研究证实,异常应力可能造成血管内皮细胞的损伤和血管栓塞,致使终板下血管分布进行性减少并导致椎间盘营养障碍<sup>[25]</sup>,同时,研究证明机械应力可调控体内多种组织器官细胞表达 VEGF<sup>[26,27]</sup>。因此,本研究从 VEGF 入手,探讨持续压力引起终板内血管芽损伤的分子作用机制,以进一步阐述异常应力导致椎间盘营养障碍诱发其退变的发生机制。实验结果表明,持续压力导致离体培养兔脊柱运动节段内椎体终板 VEGF 的表达减少,这一结果提示 VEGF 参与了椎间盘压力退变过程,其在椎间盘退变的发病过程中可能起着重要作用。

软骨细胞功能与多种细胞因子有关,调节 VEGF 在椎体终板中的表达,可能为临床有效防治椎间盘退变提供新的治疗靶点与新策略。笔者将进一步研究引起与血管生成密切相关的 VEGF 激活机制以及与其他细胞因子之间的关系,为相关防治研究提供条件。

### 参考文献

- [1] 范小良,范顺武,秦安. 椎体终板与椎间盘退变[J]. 国际骨科学杂志,2006,27(4):246-248.
- [2] 曹旺烽,陈长贤. 椎间盘软骨终板退变的研究进展[J]. 中国中医骨伤科杂志,2016,24(5):70-74.
- [3] 张小海,徐宏光,吴天亮. 椎间盘退变与生物力学[J]. 国际骨科学杂志,2010,31(3):137-138.
- [4] Feng JR, Yin HD, Chen W, et al. Finite element analysis of stress of the adjacent vertebral end plate of T<sub>12</sub> vertebral body in different compression states[J]. Chinese Journal of Tissue Engineering Research, 2016.
- [5] 吕存贤,吴永琴. 补阳还五汤对兔退变椎间盘中软骨终板血管芽的影响及意义[J]. 海峡药学,2012,24(2):33-34.
- [6] 张巍,徐宏光,俞云飞. 短时间机械循环压力对 3D 培养脊柱终板软骨细胞的影响[J]. 皖南医学院学报,2015,34(1):17-20.
- [7] 徐坤林,姜宏,刘锦涛. 破裂型椎间盘突出动物模型中新血管因子与炎症反应的研究[J]. 颈腰痛杂志,2009,30(4):310-312.
- [8] Risbud MV, Izzo MW, Adams CS, et al. An organ culture system for the study of the nucleus pulposus: description of the system and evaluation of the cells[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2003,28,2652-2658.
- [9] 彭城,任先军,梅芳瑞. 椎间盘退变与终板内微血管形态改变的相关性研究[J]. 中国矫形外科杂志,2003,11(Z2):64-66.
- [10] 徐鸿明,胡斐,王雍立,等. 兔椎体软骨终板内血管三维影像结构研究[J]. 中国脊柱脊髓杂志,2015,25(11):

1013-1017.

- [11] 朱立国,张平,宋庆慧,等. 补肾活血方对沙鼠增龄过程中腰椎软骨终板钙化干预作用的初步研究[J]. 中国骨伤,2017,30(10):926-932.
- [12] Kwon AJ, Hunter WD, Moldavsky M, et al. Indirect decompression and vertebral body endplate strength after lateral interbody spacer impaction: cadaveric and foam-block models[J]. Journal of Neurosurgery Spine, 2016,24(5):727-733.
- [13] Cadman J, Dabirrahmani D, Appleyard R. The importance of loading the periphery of the vertebral endplate[J]. International Journal of Spine Surgery, 2016,2(3):178-184.
- [14] 张昭,杨学军,宋雄英,等. 兔椎间失稳软骨终板退变后弹性内固定作用的电镜实验研究[J]. 中国矫形外科杂志,2015,23(15):1422-1426.
- [15] 李春林,李放,张志成. 腰椎间盘退变性疾患下腰椎终板形态的 MRI 观察[J]. 中国脊柱脊髓杂志,2012,22(5):393-397.
- [16] 孙旗,柳根哲,贾育松,等. 不同静水压对兔椎体终板软骨细胞相关基因表达的影响[J]. 中国矫形外科杂志,2014,22(8):753-757.
- [17] 纪经涛,胡永成,夏群,等. 血管内皮生长因子和骨形态发生蛋白在骨组织工程中的作用[J]. 中国组织工程研究,2015,19(33):5356-5363.
- [18] 沈颖. 血管内皮生长因子(VEGF)在血管外膜成纤维细胞的表达研究[J]. 当代医学,2012,18(24):24-26.
- [19] 王拥军,施杞,周重建,等. 益气化瘀方对大鼠颈椎间盘软骨终板内血管的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志,2002,10(4):3-6.
- [20] 冯璐,狄国虎,周庆军. 血管内皮生长因子及其受体家族在角膜组织及角膜病变中的作用和研究进展[J]. 中国组织工程研究,2016,20(11):1644-1650.
- [21] 王弘,陈学武,徐宏光,等. 颈椎病终板软骨组织中血管内皮生长因子和缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 表达的相关性[J]. 实用医学杂志,2008:2745-2747.
- [22] 王弘,陈学武,徐宏光,等. 血管内皮生长因子及其受体在颈椎椎体软骨终板中的表达变化[J]. 实用医学杂志,2008,24(16):1336-1338.
- [23] Li GZ, Min SF, Jia WZ, et al. Effect of Static Load on the Nucleus Pulposus of Rabbit Intervertebral Disc Motion Segment in Ex vivo Organ Culture[J]. Chinese Medical Journal, 2016,129(19):2338-2346.
- [24] Zhan JW, Feng MS, Zhu LG, et al. Effect of Static Load on the Nucleus Pulposus of Rabbit Intervertebral Disc Motion Segment in an Organ Culture[J]. BioMed Research International, 2016,2016:2481712.
- [25] 芮泽,张宁,胡志毅,等. 持续性压力促进成骨细胞分泌 VEGF 的机制[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2011,37(7):1002-1006.
- [26] Lantieri LA, Martin-Garcia N, Wechsler J, et al. Vascular endothelial growth factor expression in expanded tissue: a possible mechanism of angiogenesis in tissue expansion[J]. Plastic & Reconstructive Surgery, 1998,101(2):392-398.
- [27] 唐乾利,郭满,吴标良. 血管内皮生长因子的研究现状与进展[J]. 中国烧伤创疡杂志,2017,29(2):77-87.

(收稿日期:2017-12-03)